# Estudo quantitativo sobre a germinação dos esporos

PELO

**Dr. A. Godoy,**

Assistente.

# Ueber die Keimung der Sporen

VON

**Dr. A. Godoy,**

Assistenten.

Já haviamos iniciado o estudo da germinação dos esporos do *bacillus anthracis* em sua relação com o tempo, considerando a termo-estabilidade como indice da sua integridade, quando apareceu o trabalho de FISCHOEDER (1909).

O que se encontra na literatura deste assunto é por demais esquematico. Atribue-se a cada temperatura determinado espaço de tempo para dezenvolvimento do bacilo. As nossas experiencias não estão de acordo com esta prezunção e, dentro de certos limites de temperatura e de tempo, se obteria nas temperaturas baixas a transformação de um certo numero de esporos no espaço de tempo que se atribue a uma mais alta, assim, como, em temperatura mais alta muitos esporos deixariam de germinar dentro do lapso de tempo em que a maioria já houvesse germinado em temperatura inferior.

Als die Arbeit von FISCHOEDER (1909) erschien, hatte ich bereits das Studium der Sporenkeimung des Milzbrandbacillus in ihrem Verhältnisse zur Zeit begonnen, wobei ich die Thermostabilität als Controlle für noch nicht eingetretene Keimung gebrauchte.

Was man in der Litteratur über diesen Gegenstand antrifft, ist allzu schematisch, indem man für jede Temperatur eine bestimmte Zeit zur Entwicklung des Bacillus aufstellt. Meine Versuche stimmen mit dieser Voraussetzung nicht überein; innerhalb gewisser Zeit- und Temperaturgrenzen könnte man die Umwandlung einer gewissen Anzahl von Sporen in einer Frist erhalten, welch einer höheren Temperatur zugeschrieben wird, während dagegen bei einer höheren Temperatur viele Sporen in einem Zeitraum, in welchem bei niedrigerer Temperatur die Mehrzahl der Sporen schon gekeimt hätte, noch nicht zur Keimung schreiten. Bei mikroskopischer Beobachtung

O tempo de vejetação de um esporo, observado microscopicamente, depende da cazualidade da escolha.

A perda da termo-rezistencia dos esporos em tempo muito curto, quando transportados para um meio nutritivo foi vulgarizada por WEIL, (1901), que observou que semeando 8.600 esporos, já no fim de 10 minutos só se encontravam algumas dezenas de fórmas que rezistiam ao aquecimento. Porem, a este respeito sobresai em importancia o trabalho de FISCHOEDER recentemente aparecido em que é isto demonstrado á saciedade. Os esporos quando colocados em liquidos nutritivos e mesmo em agua fiziolojica perdem em curto tempo a rezistencia ao calor.

Os estudos já feitos não sendo suficientemente exatos não permitem conhecer a sequencia ou lei que reje a germinação. Não se póde com os rezultados obtidos, tratados pelo calculo chegar ao conhecimento do processo, quer em relação á sua interpretação, quer no que respeita á sua reprezentação matematica.

Preferimos de muito a perda da termo-estabilidade como indice da transformação dos esporos aos outros, tais como a dificuldade da coloração, de descoramento, o aparecimento de nova celula orijinaria do esporo, etc.

TECNICA. — De uma cultura esporulada de carbunculo faziamos emulsão em agua fiziolojica-glicerinada (1 parte de agua fiziolojica para 2 de glicerina). A emulsão era ajitada e filtrada atravez de papel de filtro de modo a serem eliminados os grumos. Tinhamos assim uma emulsão concentrada. Desta faziamos novamente outras diluições no mesmo liquido e por meio de contajens em placas semeadas com quantidade

hängt die Vegetationszeit einer Spore vom Zufalle der Auswahl ab.

Der Verlust der Thermoresistenz der Sporen kurze Zeit nach der Uebertragung auf einen neuen Nährboden wurde 1901 durch WEIL bekannt; derselbe beobachtete, dass schon 10 Minuten nach dem Einsäen von 8600 Sporen, die Zahl der Formen, welche dem Erhitzen widerstanden, nur einige Zehner betrug. Weit wichtiger ist jedoch in dieser Hinsicht die neueste Arbeit von FISCHOEDER, in welcher dies zur Genüge nachgewiesen ist. Die Sporen verlieren in kurzer Zeit ihre Widerstandsfähigkeit gegen Hitze, wenn sie in eine Nährflüssigkeit oder auch nur in physiologische Lösung gebracht werden.

Da die bisher angewandten Methoden nicht genau genug waren, gestatten sie nicht, die Zeitfolge oder das Gesetz zu erkennen, welche den Vegetationsprocess bestimmen. Wenn man die so gewonnenen Resultate zur Berechnung braucht, gelangt man nicht zur Feststellung des Processes, weder in Hinsicht auf seine Erklärung, noch in Beziehung auf seine mathematische Darstellung.

Zum Nachweis der Umwandlung der Sporen ziehe ich den Verlust der Thermostabilität anderen Anzeichen vor, wie sie durch die Schwierigkeit der Färbung und Entfärbung, sowie durch das Auftreten der neuen aus den Sporen hervorgegangenen Zellen geboten werden.

TECHNIK. — Von einer Milzbrandkultur mit ausgebildeten Sporen machte ich eine Emulsion in einem Teile physiologischer Lösung und zwei Teilen Glycerin. Diese wurde geschüttelt und durch Papier filtriert, so dass alle Flocken zurückgehalten wurden. Ich erhielt so eine konzentrierte Emulsion, von welcher mit derselben Lösung wieder Verdünnungen gemacht wurden, deren Sporengehalt durch Plattenkulturen berechnet wurde. Zum Ver-

conhecida julgavamos do numero de esporos por c. c. A diluição que contivesse cerca de 20.000 esporos por c. c. era a escolhida para o ensaio. O caldo que empregámos para a pesquiza da velocidade de germinação fôra preparado e distribuido em vidros de 10 c. c. que eram fechados á lampada, e continham, pois, todos, os mesmos elementos solidos, liquidos e gazozos em igual concentração.

Depois de semear 10 c. c. deste caldo com 1 c. c. da emulsão glicerinada escolhida, ajitavamos o tubo em que faziamos a mistura e em seguida adicionavamos 1 c. c. a cada tubo de vidro rezistente da serie que previamos fazer. Levavamos ao termostato. Apoz diversos espaços de tempo retiravamos um tubo que era aquecido durante 15 minutos a 65° para eliminar os esporos já transformados. Naturalmente, logo apoz a mistura tratámos tambem 1 c. c. da mistura como os seguintes, isto é, aquecemos e fizemos uma 1.ª e 2.ª placa, como já foi por nós descrito em trabalho anterior (1909); 24 ou 30 horas depois faziamos a contajem. Para maior facilidade de confronto os numeros reais de colonias obtidos foram reduzidos proporcionalmente, fazendo o numero correspondente ao tempo inicial egual a 1000.

Experiencia I

| Temperatura 22°.8 | N.° inicial de esporos 2485 | |
|---|---|---|
| Minutos | Numero obs. | Numero calc. |
| 0 | 1000 | 1000 |
| 40 | 311 | 235 |
| 70 | 67 | 79 |
| 100 | 19 | 26 |
| 130 | 8 | 8 |
| | K = 0,0157 | |

suche wurde eine Verdünnung ausgewählt, welche etwa 20000 Sporen auf den Kubiccentimeter enthielt. Die Bouillon, welche ich bei der Berechnung der Keimungsgeschwindigkeit benutzte, wurde nach der Herstellung in Gläser von 10 ccm. verteilt; letztere wurden dann zugeschmolzen und enthielten so dieselben festen, flüssigen und gasförmigen Elemente in derselben Koncentration. Nachdem 10 ccm. Bouillon mit einem Ccm. der gewählten Emulsion geimpft waren, wurde das Röhrchen geschüttelt und jedem zur Serie gehörigen Röhrchen aus widerstandsfähigen Glase 1 ccm. zugesetzt; letztere wurden dann in den Thermostaten nach Ostwald gebracht. Nach verschiedenen Zeiträumen entnahm ich ein Röhrchen, welches während 15 Minuten auf 65° erhitzt wurde, um die bereits umgewandelten Sporen zu eliminieren. Natürlich wurde auch gleich nach Herstellung der Mischung 1ccm., wie bei den nachherigen Bestimmungen behandelt, nämlich erhitzt und zu einer ersten und zweiten Platte verwandt, wie schon in einer früheren Arbeit beschrieben wurde (1909). 24—30 Stunden später wurde die Zählung vorgenommen. Zur Erleichterung der Vergleichung wurden die wirklich erhaltenen Werte der Kolonienzahlen entsprechend reduciert, so dass die Zahl, welche der Anfangszeit (0 Minuten) entsprach 1000 betrug.

Versuch I

| Temperatur 22°.8 | Ursprüngliche Sporenzahl 2485 | |
|---|---|---|
| Minuten | Gefundene Zahl | Berechnete Zahl |
| 0 | 1000 | 1000 |
| 40 | 311 | 235 |
| 70 | 67 | 79 |
| 100 | 19 | 26 |
| 130 | 8 | 8 |
| | K = 0.0157 | |

**Experiencia II**

| Temperatura 28° | N.° inicial de esporos 1622 | |
|---|---|---|
| Minutos | Numero obs. | Numero calc. |
| 0 | 1000 | 1000 |
| 8 | 430 | 400 |
| 15 | 210 | 180 |
| 25 | 72 | 75 |
| 35 | 52 | 67 |
| | K = 0,05 | |

Como se póde concluir das experiencias acima o processo é regular e obedece á mesma formula que as reações monomoleculares. Os valores calculados foram obtidos por seu intermedio.

Cotejemos os dois valores de K correspondentes ás temperaturas de 22°,8 e 28°, chegaremos de acordo com a formula VAN T'HOFF

$$\frac{c_1}{c_2} = e^{\frac{\mu}{2}\left(\frac{T_1 - T_0}{T_0\, T_1}\right)}$$

($c_1$ e $c_2$ indicam as velocidades nas temperaturas $T_0$ e $T_1$—temperaturas absolutas—e onde R, em calorias, seria egual a 2, $\mu$ uma constante) a um valor de $\mu$ egual a 19.800. Valor este que aproxima esta reação do grupo das ações hidrolizantes, zimoticas, toxicas etc. Para um intervalo de 10 gráos de temperatura dar-se-ia um aumento da velocidade da reação de cerca de 6 vezes.

Rezulta ainda de nossa pesquiza que se não póde estabelecer um tempo inicial para a germinação dos esporos; o fenomeno se passa como se fosse iniciado num tempo

**Versuch II**

| Temperatur 28° | Ursprüngliche Sporenzahl 1622 | |
|---|---|---|
| Minuten | Gefundene Zahl | Berechnete Zahl |
| 0 | 1000 | 1000 |
| 8 | 430 | 400 |
| 15 | 210 | 180 |
| 25 | 72 | 75 |
| 35 | 52 | 67 |
| | K = 0.05 | |

Wie man aus den obigen Experimenten schliessen kann, verläuft der Process regelmässig und gehorcht derselben Formel, wie die monomolekularen Reaktionen. Die berechneten Werte wurden mit derselben gefunden.

Bei Vergleichung der beiden Werte von K entsprechend den Temperaturen von 22.8 und 28.0° erhalten wir in Uebereinstimmung mit der Formel von VAN T'HOFF

$$\frac{c_1}{c_2} = e^{\frac{\mu}{2}\left(\frac{T_1 - T_0}{T_0\, T_1}\right)}$$

(wobei $c_1$ und $c_2$ die Reaktionsgeschwindigkeit bei den Temperaturen $T_0$ und $T_1$ — absolute Temperaturen—angibt; R in Kalorien = 2, und $\mu$ eine Konstante ist) einen Wert von $\mu$ = 19800, welcher die Reaktion der Gruppe der hydrolysierenden, zymotischen und dergl. Wirkungen nähert.

Für ein Intervall von 10 Temperaturgraden erhält man eine ca. 6malig Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Aus meiner Untersuchung geht noch hervor, dass man für die Keimung der Sporen keine Anfangszeit aufstellen kann; die Erscheinung verläuft, wie wenn sie in

infinitamente pequeno e correspondesse sua velocidade á constante K = 0.0158 na temperatura de 22°.8.

Conhecido pelos trabalhos de MADSEN e MAX NYMAN (1907) a aplicabilidade das referidas formulas á destruição dos esporos tanto pelas altas temperaturas como pelos dezinfetantes, rezulta que se póde julgar a germinação dos esporos como uma destruição, dando-se neste cazo uma transformação da substancia termoestavel sem, porem, aniquilar a vida.

Concluimos dizendo que a germinação é comparavel a um fenomeno de destruição monomolecular e que provavelmente obedece, no que diz respeito á influencia da temperatura, á formula de VAN T'HOFF—ARRHENIUS.

einer unendlich kurzen Zeit begonnen hätte und ihre Geschwindigkeit einer Konstanten K = 0.0158 bei einer Temperatur von 22°.8 entspräche.

Da durch die Arbeiten von TH. MADSEN und MAX NYMAN (1907) die Anwendbarkeit der erwähnten Formeln auf die Zerstörung der Sporen sowohl durch hohe Temperaturen, als durch Desinficientien erwiesen ist, folgt, dass man die Keimung der Sporen als eine Zerstörung ansehen kann, indem in diesem Falle eine Zerstörung der thermostabilen Substanz ohne Verlust des Lebens stattfindet.

Ich schliesse mit der Feststellung, dass die Keimung der Sporen sich mit einem monomolecularen Zerstörung vergleichen lässt und in Hinsicht auf den Einfluss der Temperatur wahrscheinlich der Formel von VAN T'HOFF-ARRHENIUS entspricht.

---

## BIBLIOGRAFIA.


WEIL . . . . . 1901 Archiv f. Hyg., Bd. 36, S. 205.

TH. MADSEN und MAX NYMAN . . . 1907 Oversigt over d. k. danske Vid. Selskabs Forth. N. 3. Apud Communications de l'Institut Sérotherapique de l'Etat Danois. Extraits. Tome II. 1908.

F. FISCHOEDER . . . 1909 Centralblatt f. Bakt. etc. I Abt. Bd. 51, Heft 4.

A. GODOY . . . . 1909 Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Tomo I, p. 81